

오징어 먹즙 첨가에 따른 저염 오징어 젓갈의 적정산도 및 유리아미노산의 변화

오성천[†]

[†]대원대학교 식품영양과
(2011년 12월 8일 접수 ; 2011년 12월 26일 채택)

The Changes of Titrable Acidity and Free Amino Acids in Low Salt Fermented Squid Affected by Adding to Squid Ink

Sung-Cheon Oh[†]

[†]Dept. of Food and nutrition, Daewon University College, Jecheon 390-702, Korea
(Received December 8, 2011 ; Accepted December 26, 2011)

Abstract : Squid ink was added to the low salt fermented squid by 4% of concentration and ripened at 10°C for 6 weeks and at 20°C for 28 days. The effect of the squid ink on the titrable acidity and free amino acids of low salt fermented squid were investigated. The results are as follows;

The titrable acidity in the salt fermented squid without addition of the squid ink was continuously decreased except for the salt fermented squid with 9% salt content till the latter stage of the ripening, had larger decreasing range than treatment groups.

Seeing the composition of free amino acid, the major amino acids are proline, arginine, glutamic acid, leucine and glycine.

Keywords : squid ink, free amino acids, titrable acidity, low salt fermented squid

1. 서론

우리나라의 전통적인 발효식품인 장류, 김치류, 젓갈류는 우리나라 3대 염장발효식품이라 일컬을 수 있는 것으로 장류와 젓갈류는 단백질과 지방의 공급원으로, 김치류는 비타민과 무기질의 공급원으로 이용되어 왔으며, 쌀을 주식으로 하는 우리나라를 비롯한 동남아 각국에서 옛부터 기호식품으로서 젓갈류가 애용되

어 왔다[1].

젓갈은 상온에서의 장기 저장을 목적으로 원료인 어패류에 20% 이상의 식염을 첨가하여 장기간 숙성시켜 고유풍미를 내도록 하는 것이 전통적인 제법이지만 짠맛이 너무 강한 것이 문제점으로 지적되고 있다. 소금의 과다섭취는 신장병, 고혈압을 유발시키는 원인이 될 수 있기 때문이다[2-3]. 이러한 건강상의 최근 소비자의 기호 패턴의 변화 등으로 저염 추세에 따라 식염농도가 5-7% 정도의 저염젓갈이 주류를 이루고 있다.

[†]주저자 (E-mail : osc5000@mail.daewon.ac.kr)

본 연구에서는 오징어 젓갈의 저장성과 품질향상을 목적으로 5%, 7%, 9%의 식염 및 오징어 먹즙 4%를 첨가한 저염 젓갈을 시험 제조하여 실온인 20°C 및 저온인 10°C에서 숙성시켰을 때 적정산도와 및 유리아미노산의 변화를 비교·분석하였다.

2. 실험

2.1. 실험재료

1) 원료

오징어 젓갈의 원료는 동해안에서 어획된 동결상태의 연안산 오징어(Squid, *Todarodes pacificus*)를 구입하여 사용하였으며 원료 오징어의 크기는 평균적으로 중량이 480.2g, 길이는 몸통부 15.5cm, 지느러미부 9.7cm, 다리부 29.4cm이었다.

2) 분석용 시료의 제조

냉동된 오징어를 4°C에서 해동 후 내장, 머리, 다리와 지느러미를 분리하고 몸통육만을 사

용하였으며, 저염 오징어 젓갈은 Table 1과 같은 조성에 따라 제조하였다. 오징어 먹즙을 첨가하지 않은 것과 4% 첨가하여 온도는 10°C와 20°C에서 각각 숙성 유지시켰다. 10°C에서 숙성시킨 것은 1주일 간격으로, 20°C는 4일 간격으로 꺼내어 분석용 시료로 사용하였다.

2.2. 실험방법

1) 일반성분

일반성분은 A.O.A.C.법[4]에 따라 측정하였다. 즉, 수분정량은 상압가열건조법(105°C 건조법), 조단백질의 정량은 semimicro-kjeldahl법, 조지방의 정량은 Soxhlet추출법, 회분의 정량은 직접회화법으로 측정하였다.

2) 적정산도[5]

시료 5g에 증류수 50ml를 넣고 균질화하여 여과한 여과액 10ml를 취하여 숙성중 생성된 산을 0.1N NaOH용액으로 적정하여 lactic acid 함량 %로 산출 하였다.

Table 1. The Compositions of Low Salt Squid Samples with Squid Ink before Fermented

Fermentation temperature (°C)	Composition (%)		
	Squid meat	Squid ink	Sodium chloride
10	95	0	5
	93	0	7
	91	0	9
	91	4	5
	89	4	7
	87	4	9
20	95	0	5
	93	0	7
	91	0	9
	91	4	5
	89	4	7
	87	4	9

3) 유리아미노산

시료중의 아미노산 분석은 phenylisothiocyanate (PITC) 유도체를 만들어 HPLC로 분석하는 Pico.tag 아미노산 분석방법[6]에 의해 행하였다. 즉, 유리아미노산은 시료 20ml를 95% 에탄올 80ml와 혼합하여 균질화한 다음 다시 25%의 TCA용액을 가하여 단백질을 침전시킨후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리(MSE사의 EK-352 원심분리기 사용)하여 얻은 상층액을 Amberlite IR-120 column (100-200mesh, 2cm x 20cm)에 1-2ml/min 의 속도로 흘려 아미노산을 흡착시킨 후 이를 2N NH₄OH 용액에서 용출시켜 감압 농축 한 다음 일정량을 취하여 각각 phenylisothiocyanate(PITC) 유도체를 만든후 pH 2.2의 citric acid buffer를 가하여 5mmol의 농도가 되도록 희석한 후 0.2 μ m의 membrane filter로 여과하여 분석용 시료로 하였으며 HPLC의 작동조건은 다음 Table 2와 같다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 일반성분

본 실험에 사용한 원료 오징어의 일반성분분석 결과는 Table 3과 같다.

원료 오징어의 수분함량은 78.4%, 조단백질,

조지방, 조회분함량은 각각 18.2%, 1.0%, 1.6%로 구성되어 있는데, 원료의 산지, 어획시기 등에 따라 차이가 있을 것으로 사료된다. 오징어 젓갈 제조시 내장을 제거한 원료 오징어의 어육인 몸통부분만을 사용하여 단지 식염만을 첨가해서 제조하였기 때문에 지방함량이 적고 단백질함량이 비교적 높은 것을 알 수 있다.

3.2. 적정산도의 변화

10°C, 5% 식염 첨가처리구에서 오징어 먹죽 농도를 달리하여 제조한 오징어 젓갈의 숙성 중 적정산도의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 1과 같다. 오징어 먹죽 무처리구는 0.97%에서 숙성 8주에 0.66%로, 2% 오징어 먹죽 첨가처리구는 0.75%로 완만하게 감소하며, 4% 오징어 먹죽 첨가처리구는 0.70%로 감소하였다.

10°C, 7% 식염 첨가처리구에서 오징어 먹죽 농도를 달리하여 제조한 오징어 젓갈의 숙성 중 적정산도의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다. 숙성 8주에 각각 오징어 먹죽 무처리구는 0.77%, 2% 오징어 먹죽 첨가처리구는 0.80%로 완만하게 감소하며, 4% 오징어 먹죽 첨가처리구는 0.79%로 감소하였다.

10°C, 9% 식염 첨가처리구에서 오징어 먹죽 농도를 달리하여 제조한 오징어 젓갈의 숙성 중 적정산도의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 3과

Table 2. Operating conditions for the analysis of amino acid by HPLC

Instrument	: HP 1090 HPLC(Waters Associates Inc.USA)
Column	: Aminoquant Φ 2.1x200mm(Waters Associates Inc.USA)
Solvent	: Channels A: 200 μ M Sodium acetate buffer containing 0.018% TEA + 0.3% tetra-hydrofuran, pH 7.2 Channels B: 20% 100mM sodium acetate buffer, pH 7.2 and 40% acetonitrile + 40% MeOH
Detector	: HP 1046A UV detector at 254nm
Column temp.	: 37°C
Injection volume	: 5 μ l/min

Table 3. Proximate composition of raw squid (%)

Components	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude ash
Raw squid	78.4	18.2	1.0	1.6

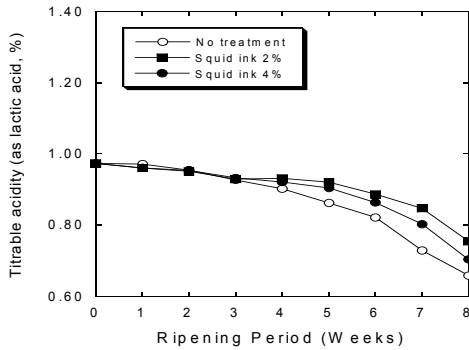


Fig. 1. The influences of squid ink on titrable acidity of 5% salt fermented squid during fermentation at 10°C.

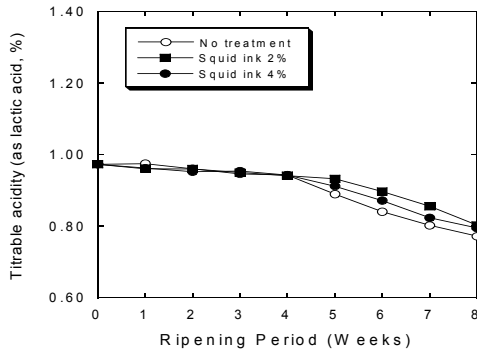


Fig. 2. The influences of squid ink on titrable acidity of 7% salt fermented squid during fermentation at 10°C.

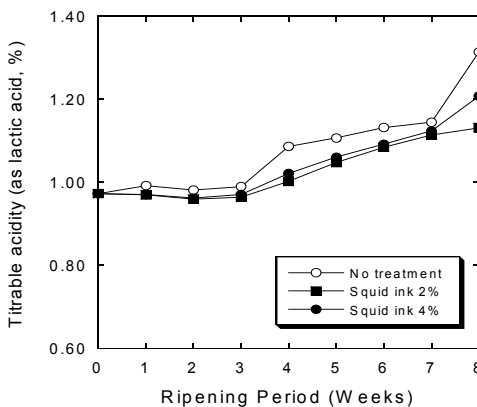


Fig. 3. The influences of squid ink on titrable acidity of 9% salt fermented squid during fermentation at 10°C.

같다. 숙성 8주에 각각 오징어 먹즙 무처리구는 1.32%로 급격하게 증가하고, 2% 오징어 먹즙 첨가 처리구는 1.13%로 완만하게 증가하며, 4% 오징어 먹즙 첨가처리구는 1.21%로 증가하였다.

20°C, 5% 식염 첨가처리구에서 오징어 먹즙 농도를 달리하여 제조한 오징어 젓갈의 숙성 중 적정산도의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다. 오징어 먹즙 무처리구는 0.97%에서 숙성 4주에 0.55%로 감소하였으며 2% 오징어 먹즙 첨가처리구는 숙성 초기에 1.00%로 증가했다가 숙성 4주에 0.60% 감소하였다. 4% 오징어 먹즙 첨가처리구는 숙성 초기에 1.04%로 증가한 후 숙성 4주에 0.61%로 감소하였다.

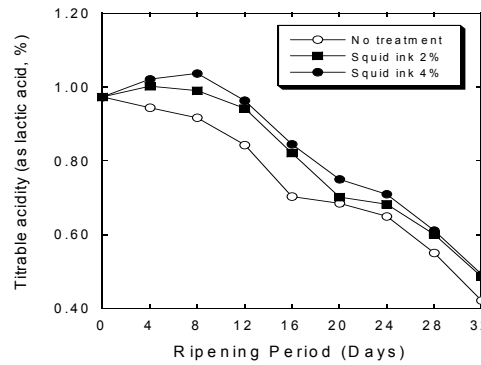


Fig. 4. The influences of squid ink on titrable acidity of 5% salt fermented squid during fermentation at 20°C.

20°C, 7% 식염 첨가처리구에서 오징어 먹즙 농도를 달리하여 제조한 오징어 젓갈의 숙성 중 적정산도의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 5와 같다. 오징어 먹즙 무처리구는 0.97%에서 숙성 4주에 0.64%로 감소하였으며 2% 오징어 먹즙 첨가처리구와 4% 오징어 먹즙 첨가처리구는 비슷한 경향을 나타냈다. 숙성 초기에 1.04%로 증가한 후 숙성 4주에 0.61%로 감소하였다.

20°C, 9% 식염 첨가처리구에서 오징어 먹즙 농도를 달리하여 제조한 오징어 젓갈의 숙성 중 적정산도의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 6과 같다. 오징어 먹즙 무처리구는 0.97%에서 숙성 4주에 0.81%로 감소하였으며 2% 오징어 먹즙 첨가처리구는 숙성 초기에 1.04%로 증가했다가

숙성 4주에 0.84% 감소하였다. 4% 오징어 먹즙 첨가처리구는 숙성 초기에 1.06%로 증가한 후 숙성 4주에 0.89%로 감소하였다. Fig. 5와 비슷한 경향을 나타냈으며 오징어 먹즙 첨가량의 차이에 따른 적정산도의 변화는 약간 있었다.

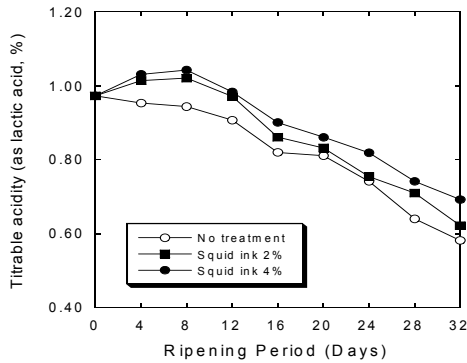


Fig. 5. The influences of squid ink on titrable acidity of 7% salt fermented squid during fermentation at 20°C.

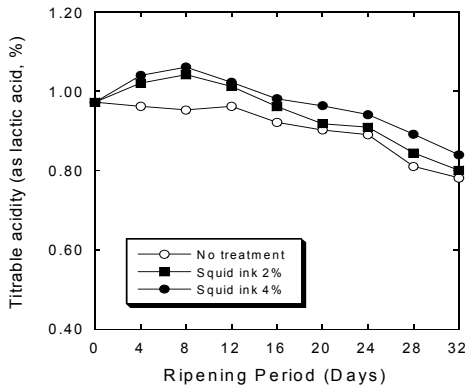


Fig. 6. The influences of squid ink on titrable acidity of 9% salt fermented squid during fermentation at 20°C.

숙성 중 적정산도는 숙성 기간의 경과에 따라 점진적으로 상승하는 경향을 나타내나 저염에서는 숙성 적기에 도달한후 감소한다. 조 [7-8]는 산도의 꾸준한 증가에도 불구하고 pH의 변화가 적은 것은 유리 아미노산과 기타 유기물질의 완충작용때문이라고 했으며, 이는 저온에서 숙성시 이 이론이 적용되며 숙성 온도가 높을때는 설명을 할 수 없다. 즉, 10°C의 저

온 숙성시 세균의 증식이 억제되었다가 이후 산 생성균의 증식이 활발해지므로 젓산을 포함한 유기산의 생성이 증가하기 때문이라고 사료된다. 따라서 숙성 기간 및 온도에 따른 pH 변화 및 적정산도의 경향을 보면 숙성 중의 pH 변화는 주로 젓산 생성량과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.

3.3. 유리아미노산의 변화

식품 중에 유기산은 그 자체로서 신맛의 원인 성분일 뿐 아니라 유리아미노산이나 정미성 핵산관련물질의 감칠맛, 단맛등과 조화를 이루므로 젓갈이나 어장유의 풍미에도 기여하는 것으로 인식되고 있다[9-11].

유리아미노산은 젓갈류의 향미에 가장 중요한 영향을 미치는 단백질의 분해산물로서 발효시에도 중요한 품질지표로 활용되고 있다.

Table 4는 10°C에서 숙성시킨 5%, 9% 식염 첨가처리구를 대상으로 하여 6주째 시료의 유리아미노산 함량을 조사한 결과로 5% 식염 첨가처리구의 경우 proline 258.1mg/ml, alanine 147.1mg/ml이며, 9% 식염 첨가처리구는 proline 286.9mg/ml, alanine 108.3mg/ml로 주요 아미노산이었다.

Table 5는 10°C에서 5%, 9% 식염 첨가처리구에 오징어 먹즙 4%를 첨가하여 6주째 숙성시킨 시료의 아미노산 함량을 조사한 결과인데, 주로 생성되는 아미노산은 5% 식염 첨가처리구의 경우 proline 290.6mg/ml, alanine 208.5mg/ml, glutamate 179.5mg/ml이었으며, 9% 식염 첨가처리구의 경우 proline 165.3mg/ml, alanine 74.2mg/ml, glutamate 70.2mg/ml로 40%이상을 차지하였다.

Table 6은 20°C에서 숙성시킨 5%, 9% 식염 첨가처리구를 대상으로 하여 28일째 시료의 유리아미노산 함량을 조사한 결과로 5% 식염 첨가처리구 경우 proline 360.7mg/ml, alanine 206.3mg/ml, glutamate 185.9mg/ml의 순이었으며, 9% 식염 첨가처리구는 proline 310.6mg/ml, alanine 218.2mg/ml, glutamate 166.6mg/ml로 주요 아미노산이었다.

Table 7은 20°C에서 5%, 9% 식염 첨가처리구에 오징어 먹즙 4%를 첨가하여 28일째 숙성시킨 시료의 아미노산 함량을 조사한 결과인데, 주로 생성되는 아미노산은 5% 식염 첨가처리구의 경우 alanine 233.5mg/ml, glutamate

Table 4. Free Amino Acids of Salt Fermented Squid Products during Fermentation at 10°C for 6 Weeks

Amino acids	NaCl(5%)		NaCl(9%)	
	content (mg/ml)	ratio (%)	content (mg/ml)	ratio (%)
Asp	50.315	4.13	38.684	4.07
Ser	47.922	3.93	28.426	2.99
Glu	88.945	7.30	62.931	6.62
Gly	64.775	5.32	51.181	5.39
His	74.739	6.13	73.606	7.75
Arg	84.738	6.95	57.147	6.01
Thr	35.263	2.89	20.680	2.18
Ala	147.145	12.08	108.326	11.40
Pro	258.138	21.18	286.874	30.19
Cys	9.765	0.80	6.756	0.71
Tyr	26.198	2.15	18.337	1.93
Val	39.461	3.24	23.343	2.46
Met	38.852	3.19	27.338	2.88
Lys	71.457	5.86	36.574	3.85
Ile	35.742	2.93	20.121	2.12
Leu	96.245	7.90	66.695	7.02
Phe	30.751	2.52	19.827	2.09
Trp	18.110	1.49	3.388	0.36
Total	1218.561	99.99	950.234	100.02

203.4mg/ml, proline 173.7mg/ml, glycine 171.4mg/ml이 주요 아미노산이었으며, cysteine은 검출되지 않았다. 9% 식염 첨가처리구의 경우 proline 259.2mg/ml, alanine 204.9mg/ml, glutamate 159.2mg/ml로 주요 아미노산이었다.

이는 이[12]가 보고한 오징어의 유리 아미노산 함량과 비슷한 패턴이었다. 이 중 proline은 오징어의 담백한 단맛을 내는데 관여하며, alanine, glutamate 등이 오징어류의 식미와 밀접한 관계가 있을 것이라고 생각된다.

유리 아미노산은 수산동물의 종류에 따라 현저하게 다르고, 한 두 종류의 아미노산이 총 유리아미노산의 50%를 차지하는 경우가 많다. 오징어 젓갈의 숙성 중 총 유리아미노산 함량은 발효 기간이 경과함에 따라 대체로 증가하는

경향을 나타낸다. 한편 Kim 등[13]은 오징어식해에는 proline, glutamate, alanine과 histidine이 주요 유리 아미노산이라고 하였고, Takai 등[14]은 proline, leucine, glutamate, lysine과 alanine이라고 하였으며 Nagasaki 등[15]은 오징어 젓갈 숙성 중 세균에 의해 분해되기 쉬운 proline이 숙성말기까지 존재하였으므로 숙성 중 세균의 관여가 적다고 보고하였는데 본 연구 결과와 비슷하였다. Nagao[16]는 오징어 젓갈의 숙성 초기에 아미노산이 급격히 증가하였으나 세균은 말기에 급격한 증가를 나타내었으므로 초기의 아미노산생성에는 자가소화효소가 관여하며, 세균은 후기의 변화에 관여한다고 보고 하였다.

Table 5. Free Amino Acids of Salt Fermented Squid Products with 4% Squid Ink during Fermentation at 10°C for 6 Weeks

Amino acids	NaCl(5%)		NaCl(9%)	
	content (mg/ml)	ratio (%)	content (mg/ml)	ratio (%)
Asp	75.636	4.96	38.572	5.24
Ser	45.923	3.01	25.156	3.42
Glu	179.494	11.77	70.216	9.54
Gly	115.625	7.58	35.240	4.79
His	70.543	4.63	39.339	5.34
Arg	0.418	0.03	42.054	5.71
Thr	25.002	1.64	19.060	2.59
Ala	208.487	13.67	74.202	10.08
Pro	290.643	19.06	165.339	22.46
Cys	7.456	0.49	11.157	1.52
Tyr	16.676	1.09	19.543	2.65
Val	91.211	5.98	25.116	3.41
Met	59.664	3.91	24.158	3.28
Lys	58.128	3.81	31.605	4.29
Ile	74.963	4.92	20.462	2.78
Leu	138.139	9.06	60.909	8.27
Phe	58.277	3.82	21.628	2.94
Trp	8.716	0.57	12.479	1.69
Total	1525.001	100.00	736.235	100.00

Table 6. Free Amino Acids of Salt Fermented Squid Products during Fermentation at 20°C for 28 Days

Amino acids	NaCl(5%)		NaCl(9%)	
	content (mg/ml)	ratio (%)	content (mg/ml)	ratio (%)
Asp	21.786	1.47	108.838	6.81
Ser	2.465	0.17	4.533	0.28
Glu	185.938	12.52	166.741	10.44
Gly	131.191	8.84	95.566	5.98
His	8.268	0.56	24.719	1.55
Arg	0.655	0.04	8.623	0.54
Thr	53.496	3.60	76.049	4.76
Ala	206.286	13.90	218.232	13.66
Pro	360.725	24.30	310.682	19.45
Cys	4.602	0.31	1.544	0.10
Tyr	19.213	1.29	31.706	1.98
Val	97.288	6.55	84.898	5.31
Met	66.704	4.49	53.750	3.36
Lys	30.153	2.03	103.839	6.50
Ile	77.712	5.23	72.600	4.54
Leu	144.883	9.76	150.480	9.42
Phe	63.856	4.30	59.359	3.72
Trp	9.370	0.63	25.414	1.59
Total	1484.591	99.99	1597.573	99.99

Table 7. Free Amino Acids of Salt Fermented Squid Products with 4% Squid Ink during Fermentation at 20°C for 28 Days

Amino acids	NaCl(5%)		NaCl(9%)	
	content (mg/ml)	ratio (%)	content (mg/ml)	ratio (%)
Asp	15.582	1.11	63.691	3.74
Ser	5.281	0.38	8.145	0.48
Glu	203.391	14.55	159.195	9.35
Gly	171.449	12.26	136.861	8.04
His	2.987	0.21	33.022	1.94
Arg	2.452	0.18	2.503	0.15
Thr	86.193	6.17	87.458	5.13
Ala	233.529	16.70	204.962	12.03
Pro	173.685	12.42	259.166	15.22
Cys	-	-	4.229	0.25
Tyr	9.530	0.68	32.913	1.93
Val	109.381	7.82	109.390	6.42
Met	52.513	3.76	71.734	4.21
Lys	52.340	3.74	115.086	6.76
Ile	75.715	5.42	96.889	5.69
Leu	121.505	8.69	155.227	9.11
Phe	57.044	4.08	77.302	4.54
Trp	25.485	1.82	85.492	5.02
Total	1398.062	99.99	1703.265	100.01

4. 결론

오징어 먹즙을 저염 오징어 젓갈에 4% 농도로 첨가하고 10°C에서 6주일간, 20°C에서 28일간 숙성시키면서 오징어 먹즙이 숙성 중 저염 오징어 젓갈의 적정산도와유리아미노산의 변화에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

오징어 먹즙을 첨가하지 않은 저염 오징어 젓갈의 적정산도는 식염 9%를 첨가한 오징어 젓갈을 제외하고는 숙성후반까지 계속 감소하였으며, 첨가군에 비하여 감소폭은 큰 경향을 나타냈다.

유리 아미노산의 조성을 보면 proline, alanine, glutamic acid, leucine, glycine이 주요 아미노산이었다.

참고문헌

1. C. H. Lee, Y. H. Lee, M. H. Lim, S. H. Kim and S. G. Choi, Characteristics of Korea Sea Fermentation Technique, *Journal of Korean statement*, **1**(3), 267 (1986).
2. A. C. Marsh, Process and Formulation that affect the sodium content of foods. *Food Technol.* **37**(7), 45 (1983).
3. F. R. Shank, , F. E. Scarbrough, , J. E. Vanderveen and A. L. Forbes, FAD prospective on sodium. *Food Technol.* **37**(7), 73 (1983).
4. A.O.A.C. : Official Methods of Analysis,

- 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. (1980).
5. A.O.A.C. : Official Methods of Analysis, 11th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. (1970).
 6. D. H. Spackman, W. H. Stein and S. Moore, Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acid. *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
 7. J. H. Jo , S. W. Oh, Y. M. Kim and D. H. Chung, Conditions of water activity of raw material and adding levels of papain and glucose for processing fermented squid with low salt concentrations. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**(1), 63 (1998).
 8. H. S. Jo, A Study on the Sikhye fluke, Korea University, Doctor Paper (1982).
 9. T. Mizutani, A. Kimizuka, K. Ruddle and N. Ishige, A chemical analysis of fermented fish products and discussion of fermented flavours in asian cuisines. *Bulletin of the National Museum of Ethnology*, **12**(3), 801 (1987).
 10. K. H. Steinkraus, Indigenous fermented amino acid, peptide sauces and pastes with meatlike flavours in "*Handbook of indigenous fermented foods*", Marcel Dekker, Inc. New York. 433 (1983).
 11. K. Amano, The influence of fermentation in the nutritive value of fish with special reference to fermented fish products of South east Asia. In *Fish in Nutrition*, Fishing News Ltd., London. 180 (1961).
 12. E. H. Lee, A study on taste compounds in certain dehydrated sea foods. *Bull. Pusan Fish. Coll.* **8**(1), 63 (1968).
 13. Y. M. Kim, M. C. Kang and J. H. Hong, Quality evaluation of low salt fermented seafoods. *J. Korean Fish. Soc.* **28**(3), 301 (1995).
 14. M. Takaki, K. Yamazaki, Y. Kawai, N. Inoue and H. Shinani, Effect of squid liver, skin and ink on microbiological characteristics of "Ika-Shiokara" during ripening process. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**(9), 1617 (1992).
 15. S. Nagasaki and T. Yamamoto, Studies on the influences on salt on microbial metabolism III. On the relation of salt concentration to the putrefaction of fish muscle and to ripening of "Ika-Shiokara", *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **20**(7), 613 (1954).
 16. K. Nagao, Bacteriological studies of shiokara or "soused squid". Studies on the ripening phenomom of shiokara. *Rep. Fac. Fish Hokkaido Univ.* **3**, 259 (1952).